

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

E.A.P. DE ODONTOLOGÍA

**Determinación de la actividad antibacteriana “in vitro”  
del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray  
“arrayán” frente a *Streptococcus mutans***

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Jessica Flores Romero

**Lima – Perú**

**2014**

## **JURADO DE SUSTENTACIÓN**

**PRESIDENTE: C.D. Jorge Eleodoro Villavicencio Gastelú**

**MIEMBRO: Mg. C.D. Martha Cecilia Rodríguez Vargas**

**MIEMBRO ASESOR: Mg. C.D. María Angélica Álvarez Páucar**

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser la luz que guía mi camino y por colocar personas maravillosas en mi vida.

A mis padres Máximo y Nicolasa por darme la vida, por brindarme su gran amor día a día, por su confianza y apoyo constante en todas las metas que me propongo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesora Mg. C.D. María Angélica Álvarez Páucar por su apoyo continuo y el tiempo dedicado a la realización de la tesis.

A la Mg. C.D. Martha Cecilia Rodríguez Vargas y al C.D. Jorge Eleodoro Villavicencio Gastelú por sus aportes y la ayuda brindada en la presente investigación.

A mi familia, que con su apoyo desinteresado me ayudó a terminar la carrera y me incentivan constantemente.

A mis amigos por estar presentes en los buenos y malos momentos.

A mi alma mater “Universidad Nacional Mayor de San Marcos” a quien llevo en mi corazón en todo momento y lugar.

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayan” frente a *Streptococcus mutans*. Se empleó el método de disco-difusión en agar. La cepa fue reactivada en placa de Tripticasa Soya Agar (TSA), incubada a 37 °C por 24 horas en microaerofilia. Se tomaron 5 colonias y se transfirieron a un tubo de ensayo con 5 mL de caldo Müller-Hinton, incubada a 37 °C por 6 horas en microaerofilia hasta obtener una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de Mc Farland. El sembrado se realizó en 14 placas con agar Müller-Hinton mediante la técnica de difusión, utilizando el aceite esencial en concentraciones de 10, 50 y 100%, y se procedió a la incubación en microaerofilia a 37 °C por 24 horas. El análisis estadístico se realizó con el programa STATA Versión 12. Las concentraciones al 10, 50 y 100% presentaron un halo de inhibición promedio de 6.28, 7.88 y 8.66 mm respectivamente, la diferencia de promedios entre estas tres concentraciones mostró diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ). Se concluye que las tres concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayan”, presentan actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*.

**Palabras claves:** *Streptococcus mutans*, arrayan, actividad antibacteriana.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the antibacterial activity of the essential oil of *Luma chequen* (Molina) A. Gray "myrtle" against *Streptococcus mutans*. The disk-diffusion method in agar was used. The strain was reactivated in Trypticase Soy agar plate (TSA), incubated at 37 °C for 24 hours in microaerophilic. 5 colonies were picked and transferred to a test tube with 5 mL of Mueller-Hinton broth , incubated at 37 °C for 6 hours under microaerophilic conditions until a turbidity equivalent to 0.5 Mc Farland scale . Seeding was performed on 14 plates with Mueller-Hinton agar by diffusion technique, using the essential oil in concentrations of 10, 50 and 100% , and the incubation proceeded in microaerophilic at 37 °C for 24 hours . Statistical analysis was performed using STATA Version 12 program. Concentrations of 10 , 50 and 100 % had a halo of inhibition average of 6.28 , 7.88 and 8.66 mm respectively, the mean difference between these three concentrations showed statistically significant difference ( $P<0.05$ ). We conclude that the three concentrations of the essential oil of *Luma chequen* (Molina) A. Gray " myrtle " , exhibit antibacterial activity against *Streptococcus mutans* .

**Keywords:** *Streptococcus mutans*, myrtle, antibacterial activity.

## CONTENIDO

	Pag.
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>	3
2.1 Área problema	3
2.2 Delimitación del problema	3
2.3 Formulación del problema	4
2.4 Objetivos de la investigación	4
2.4.1 Objetivo general	4
2.4.2 Objetivos específicos	4
2.5 Justificación de la investigación	5
2.6 Limitaciones de la investigación	5
<b>III. MARCO TEÓRICO</b>	6
3.1 Antecedentes	6
3.2 Bases teóricas	11
3.2.1 <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray “arrayan”	11
3.2.1.1 Clasificación sistémica y variedades del género	11
3.2.1.2 Descripción y características morfológicas	12
3.2.1.3 Distribución y hábitat	15
3.2.1.4 Usos y propiedades medicinales	15
3.2.1.5 Aceite esencial y <i>Luma chequen</i>	16
3.2.1.6 Composición química del aceite esencial	17
3.2.2 Clorhexidina	19

3.2.2.1 Descripción	19
3.2.2.2 Propiedades	20
3.2.2.3 Mecanismo de acción	22
3.2.2.4 Presentaciones	25
3.2.3 <i>Streptococcus mutans</i>	27
3.2.3.1 Clasificación	27
3.2.3.2 <i>S. mutans</i> y grupo mutans	27
3.2.3.3 Descripción	28
3.2.3.4 Estructura celular	29
3.2.3.5 Factores de virulencia	30
3.2.3.6 Hábitat	31
3.2.4 Fitoterapia	32
3.2.4.1 Definición	32
3.2.4.2 Usos de la fitoterapia	32
3.3 Definición de términos básicos	33
3.4 Hipótesis y variables	34
3.5 Operacionalización de variables	35
<b>IV. METODOLOGÍA</b>	36
4.1 Tipo de investigación	36
4.2 Población y muestra	36
4.3 Procedimientos y técnicas	37
4.3.1 Obtención del aceite esencial	37
4.3.2 Determinación de la actividad antibacteriana in vitro	38
4.4 Procesamiento de datos	45
4.5 Análisis de resultados	46



<b>V. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>58</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>60</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>61</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>67</b>

## I. INTRODUCCIÓN

En la cavidad bucal existe una gran variedad de microorganismos que se caracterizan por ser extremadamente complejos en géneros y especies, estos son responsables de la gran mayoría de procesos infecciosos bucales, entre ellos: caries y enfermedades periodontales. La caries dental es la más frecuente que afecta la dentición temporal y permanente de nuestra población, es una enfermedad multifactorial, donde se evidencia la interacción de cuatro factores principales: hospedero, dieta, tiempo y microbiota <sup>1</sup>. La formación de la placa bacteriana ocurre a través de la fijación de bacterias sobre las superficies dentarias. Así la placa bacteriana, debido a su característica de agregación continua, va adquiriendo nuevas especies en cada etapa de su desarrollo. Dentro de estos microorganismos se pueden encontrar: *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S.sobrinus* y *L.casei* <sup>2</sup>. Siendo, el *Streptococcus mutans* considerado como el microorganismo más frecuentemente aislado en placa dentobacteriana; se trata de combatirlo encontrando mecanismos para su control a través del uso de sustancias antimicrobianas.

En los últimos años, el uso de alternativas naturales a través de hierbas con propiedades medicinales está siendo estudiado científicamente, con el fin de utilizarlos en el tratamiento de afecciones bucales más prevalentes en nuestra población.

*Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” es una especie ampliamente utilizada en la sierra central y sur de nuestro país por los pobladores que la cultivan tradicionalmente por sus múltiples propiedades. El presente

estudio trata de demostrar científicamente las propiedades antibacterianas que presenta en cavidad oral, con el fin de proporcionarle a la población una alternativa natural, económica y de fácil alcance frente a los problemas de salud oral a los que puedan estar expuestos.

## **II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

### **2.1 Área problema**

Las plantas medicinales han acompañado la evolución del hombre e históricamente han estado ligadas a la forma de cura ancestral. Durante mucho tiempo los productos naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal recurso que disponían los médicos. Esto hizo se profundizase el estudio de las especies vegetales, ampliar sus experiencias y su empleo <sup>3</sup>.

El Perú, como país con amplia biodiversidad, alberga gran cantidad de especies vegetales. Posee cerca de 80 mil especies, lo que representa el 10% de la flora total mundial <sup>4</sup>. La fitoterapia, no ha dejado de tener vigencia. Muchas de las plantas medicinales y los remedios que se utilizaban antiguamente, se siguen usando.

### **2.2 Delimitación del problema**

En el Perú existen muchas especies de plantas con propiedades medicinales conocidas, que son utilizadas comúnmente por la población, también existe gran cantidad de plantas aún no investigadas

científicamente que prueben su actividad farmacológica en cavidad oral; como *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”, del cual existen estudios que prueban su actividad antimicrobiana, pero existen escasos estudios sobre la actividad antibacteriana en microorganismos propios de la cavidad bucal.

### **2.3 Formulación del problema**

¿Existe actividad antibacteriana del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans*?

### **2.4 Objetivos de la investigación**

#### **2.4.1 Objetivo general**

Determinar la actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans*

#### **2.4.2 Objetivos específicos**

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans*

- Comparar el efecto del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*
- Comparar el grado de sensibilidad de *Streptococcus mutans* frente a la Clorhexidina al 0.12 % y al aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”

## 2.5 Justificación de la investigación

En nuestro país, existen muchas comunidades, que por su localización, presentan dificultades para acceder fácilmente a los servicios de salud, tienen a su alrededor variedad de especies vegetales que podrían ser utilizadas medicinalmente conociendo sus propiedades terapéuticas. El uso de plantas medicinales está al alcance de la población, de esta manera resultaría accesible tratar las afecciones bucales, reduciendo así las enfermedades cariogénicas en la población de manera significativa.

Se ha descrito que el uso de la biotecnología, permite investigaciones que contribuyen a la descripción de nuevos principios activos u otros compuestos fitoquímicos que servirán como base en la experimentación farmacológica o síntesis de nuevos fármacos, que ayuden en el tratamiento de muchas enfermedades que aquejan a la comunidad en general <sup>5</sup>.

## 2.6 Limitaciones de la investigación

- Escasas investigaciones científicas referidas a los beneficios de las propiedades de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” en el campo odontológico.
- La recolección de las hojas de la planta se realizará en una época apropiada.

## III. MARCO TEÓRICO

### 3.1 Antecedentes

**Lazo W. (1990)** realizó un estudio acerca de la acción antimicrobiana de algunas plantas de uso medicinal en Chile, encontró que el desarrollo de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* fue inhibido por la decocción y el extracto de etanol de cáscara de frutos de *Punica granatum* L., raíz de *Geum quellyon* Sweet, corteza de *Quillaja saponaria* Mol.; la decocción y el extracto en acetato de etilo de cotiledones de *Lucuma biferá* Mol.; la decocción y el extracto en etanol o acetato de etilo de hojas y tallos de *Calceolaria thyrsiflora* Graham, *Sphacele salviae*, *Haplopappus baylahuen* Remy y la decocción y los extractos en etanol, acetato de etilo y cloroformo de *Luma chequen* (Mol.) A. Gray <sup>6</sup>.

**Labbé C. y et al (2002)** investigaron acerca de los flavonoides bioactivos de *Luma chequen*, y en un estudio químico guiado por bioensayo del extracto metanólico de las hojas frescas de *Luma chequen* condujo al aislamiento de lumaflavonoides A(1), B(2) y C(3), cuyas estructuras son propuestas sobre la base de los datos espectroscópicos de NMR. Los bioensayos mostraron que las fracciones 1 y 2 presentan mejor actividad fungistática frente a la cepa de *Botrytis cinerea*<sup>7</sup>.

**Carhuapoma M. (2006)** realizó un estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”, una especie nativa con virtudes antiinflamatoria, antimicrobiana y conservante de tejidos pos mortem, en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. El objetivo del estudio fue caracterizar la composición química y determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen*. Los resultados, sugieren que el aceite esencial de *Luma chequen* posee actividad antioxidante, debido a la estructura de sus constituyentes químicos<sup>8</sup>.

**Carpio A (2008)** Realizó un estudio preliminar de actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra bacterias de la cavidad oral, en la facultad de odontología de la UPCH. Encontró resultados positivos para 24 extractos de 27 de estas plantas. Los extractos con mayor efecto antimicrobiano corresponden a las especies *Momordica charantia* L., *Piper dumosum* Rudge, *Byrsonima poeppigiana* A. Juss,

*Anacardium occidentale* L., *Psidium guajava* L., *Marcia paivae* O. Berg *Couroupita guianensis* Aubl., *Vismia angusta* Miq., y cuatro aceites esenciales correspondientes a las especies *Cymbopogon citratos* Staf, *Mentha pulegium* L, y *Minthostachys mollis* (Kunth) Grises<sup>9</sup>.

**Castro LA. (2008)** Estudió acerca de la composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*, señalando que *Luma chequen*, mostró efecto antioxidante con aplicación de tres modelos antioxidantes; concluyendo que las moléculas del aceite esencial actúan en sinergismo potenciando su capacidad antiradicalaria, dando una protección a las macro moléculas biológicas, como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, por lo que es usado para tratar afecciones de las vías respiratorias<sup>10</sup>.

**Gonçalves M. y et al (2011)** Estudiaron la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite comercial disponible de *Luma chequen* (Molina) A. Gray. La actividad antibacteriana y antifúngica del aceite y los tres constituyentes principales ( $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y linalol) se evaluaron contra tres bacterias Gram positivas y dos bacterias Gram negativas, dos levaduras y tres hongos filamentosos por el método de difusión en disco. Discos con cloranfenicol (30 mg), ampicilina (10 mg) y nistatina (100 unidades), se utilizaron para controlar la sensibilidad de los microorganismos ensayados. Éstos



fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus faecalis* CECT 795, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* CECT 484, *Candida albicans* CECT 1394, *Cryptococcus neoformans* CECT 1078, *Cladosporium cladosporioides* CECT 2111, *Aspergillus niger* CECT 2574 y *Aspergillus fumigatus* CECT 2071. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, la media y desviación estándar se calcularon para los diámetros de la zona de inhibición. La prueba de difusión en disco utilizada, mostró que el aceite de *L. chequen* era activo contra todos los microorganismos ensayados, excepto *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis* y *Aspergillus niger*. Sin embargo, el aceite resultó ser significativamente más activa contra *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus neoformans* y *Cladosporium cladosporioides*. La actividad antimicrobiana de los tres constituyentes principales del aceite también se ensayaron contra las mismas cepas. La actividad del aceite esencial puede estar asociada con la importante contribución de  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y linalol. La actividad antimicrobiana del aceite esencial también se determinó usando la técnica de dilución, mediante la medición de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Cladosporium cladosporioides* y *Aspergillus fumigatus*. El aceite esencial mostró actividad significativa frente a *Proteus vulgaris*, *Cryptococcus neoformans* y *Cladosporium cladosporioides*, con valores de CIM que oscilan desde 0,45 hasta 1,67 l / ml <sup>11</sup>.

**Simirgiotis M. y et al (2013)** Estudiaron la capacidad antioxidante, el contenido de polifenoles y los perfiles HPLC-DAD-ESI/MS de compuestos fenólicos de bayas sudamericanas de *Luma apiculata* y *Luma chequen*, encontrando 12 compuestos fenólicos en frutos de *L. apiculata* y 12 en las partes aéreas, mientras que *L. chequen* produjo 10 compuestos en los frutos y 16 en las partes aéreas. Toda la baya y extractos de las partes aéreas presentan alta capacidad antioxidante en el ensayo de DPPH (IC<sub>50</sub> de 10,41±0,02 y 2,44±0,03g/ml para *L. apiculata*, 12,89±0,05 y 3,22±0,05 para *L. chequen*), que puede estar relacionado con el rango diverso de compuestos fenólicos detectados. La capacidad antioxidante junto con los altos contenidos polifenólicos y compuestos identificados puede apoyar al menos en parte, su uso como medicamentos botánico <sup>12</sup>.

## 3.2 Bases teóricas

### 3.2.1 *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”

#### 3.2.1.1 Clasificación sistémica y variedades del género

Según el sistema de clasificación de A. Cronquist (1981), determinados por Beltrán SH y Soria LR, se ubica en la siguiente categoría taxonómica: <sup>13</sup>

DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Rosidae
ORDEN	: Myrtales
FAMILIA	: MYRTACEAE
GÉNERO	: <b><i>Luma</i></b>
ESPECIE	: <b><i>Luma chequen</i></b> (Molina) A.Gray.

SINONIMIA VULGAR: “Arrayán”, “Wallpuma”, “Rayán castilla” y “Luma”.

SINONIMIA CIENTÍFICA: *Eugenia bella* de *Luma chequen*, *Eugenia chequen* de *Luma chequen*, *Eugenia gayana* de *Luma chequen*, *Eugenia myrtomimeta* de *Luma chequen*, *Eugenia pulchra* de *Luma chequen*, *Luma gayana* de *Luma*

*chequen*, *Myrceugenella chequen* de *Luma chequen*, *Myrceugenella chequen* var. *myrtomimeta* de *Luma chequen*, *Myrceugenella gayana* de *Luma chequen*, *Myrceugenella langerfeldtii* de *Luma chequen*, *Myrtus chequen* de *Luma chequen*, *Myrtus gayana* de *Luma chequen*, *Myrtus uliginosa* de *Luma chequen*, *Myrtus uliginosa* var. *f. major* de *Luma chequen* <sup>14</sup>.

### **3.2.1.2 Descripción y características morfológicas**

Arbusto que puede llegar a medir entre los 5 a 6m de altura y alcanza una cobertura de 5m de diámetro. Es coposo, con follaje denso y siempre verde. La copa es globosa y va desde el primer o segundo tercio. La corteza externa es lisa de color marrón claro, la corteza interna es de color blanquecino, con olor tenue y agradable. Las hojas son simples, opuestas y decusadas. Las láminas son elípticas de 0.5 a 2.5 cm de longitud y 0.3 a 1.5 cm de ancho, con el ápice agudo, el borde entero y la base obtusa. Los peciolos son muy cortos, de 1 a 2 mm de longitud. Las hojas son lisas y tienen un olor agradable al ser estrujadas. Las flores son blancas, solitarias, axilares, hermafroditas, actinomorfas y tetrámeras, son de mediano tamaño, de 1 a 2 cm de longitud; presentan numerosos estambres libres de 7 mm de longitud y pistilo muy pequeño. Los frutos son

globosos, rojizos con pocas semillas y escaso endosperma

8,15,16

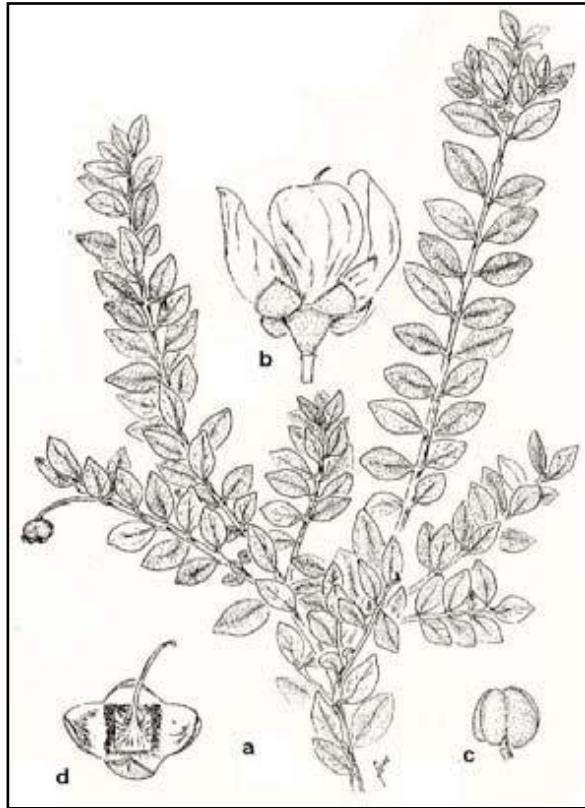


Figura 1: *Luma chequen*  
a. Rama con frutos, b. Flor, c.  
Antera, d. Cáliz y pistilo <sup>16</sup>





Figura 2: Arbusto de *Luma chequen*<sup>8</sup>



Figura 3: Ramas y hojas de *Luma chequen*<sup>8</sup>



Figura 4: Flor de *Luma chequen*<sup>8</sup>



Figura 5: Fruto de *Luma chequen*<sup>15</sup>

#### 3.2.1.3 Distribución y hábitat

Se encuentra en los andes de Sudamérica central, entre Perú, Bolivia y Chile. Crece desde los 2500 a 4000 m.s.n.m. En el Perú, se distribuye en la sierra central y sur del país, puede encontrarse en departamentos como Ancash, Cerro de Pasco, Lima, Junín, Ayacucho y Cusco, con predilección hacia el sur. Se desarrolla en terrenos con humedad del subsuelo y a orillas de los ríos<sup>8,13</sup>.

#### 3.2.1.4 Usos y Propiedades medicinales

Dentro de las propiedades medicinales; se puede mencionar que las hojas y meristemas apicales del tallo de *Luma chequen* son usadas por las comunidades locales para los tratamientos de tos, odontalgia, desordenes gastrointestinales e infecciones pos parto<sup>11</sup>.

También, en estudios etnobotánicos, se mencionan sus propiedades antireumática, antidiarreico, antiséptico, astringente, balsámico, hemostático, vasoconstrictor, antineurálgico, antiinflamatorio y analgésico<sup>17</sup>.

En el departamento de Arequipa, las ramas se utilizan para realizar baños en casos de “mal de aire” y después del parto<sup>18</sup>.

Se encontró también que las hojas aromáticas son usadas en forma de infusión debido a sus propiedades carminativas <sup>19</sup>.

En algunos pueblos del departamento de Ayacucho, las hojas y ramas jóvenes son usadas en forma de cocción, llamándola “agua de arrayán”, para evitar la putrefacción de tejidos pos morten conservándolos por muchos años <sup>8,13,14</sup>.

Además, la madera de esta especie es dura y durable, aunque no alcanza diámetros grandes, se le utiliza para la elaboración de utensilios y herramientas agrícolas. La leña y el carbón son de excelente calidad. El follaje es empleado como aromatizante y saborizante en la cocina y como condimento en la preparación de embutidos <sup>13</sup>.

#### **3.2.1.5 Aceite esencial y *Luma chequen***

Los aceites esenciales son el resultado de la mezcla de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas. Constituyen la fracción líquida volátil, generalmente destilable por arrastre con vapor de agua, que contienen sustancias responsables del aroma de las plantas y que son responsables en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica. Tras su producción a partir de tejidos secretores, se almacenan en distintos órganos de la planta; en su gran mayoría son de olor agradable <sup>20,21</sup>.



Los aceites esenciales se clasifican: según su consistencia (esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas), según su origen (naturales, artificiales y sintéticas) y según la clase química de componentes principales (monoterpenoides, sesquiterpenoides, fenilpropanoides) <sup>20</sup>.

### 3.2.1.6 Composición química del aceite esencial

El aceite esencial de Luma chequen presenta los siguientes constituyentes:

**Tabla 1: Composición química del aceite esencial de Luma chequen <sup>8</sup>**

CONSTITUYENTES	%	RI <sub>1</sub>	RI <sub>2</sub>	METODOS DE IDENTIFICACION
2-metilbutirato de etilo	0.1	152	121	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
Isobutirato de isobutilo	1.1	195	137	GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
α-tuyona	0.3	208	-	RI <sub>1</sub> , GC-MS
α-pineno	57.3	215	113	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
Canfeno	0.2	219	126	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
β-pineno	6.2	231	147	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
Isobutirato de 2-metilbutilo	1.7	247	-	GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
p-cimeno	0.9	251	238	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
1,8-cineol	7.5	256	209	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
Limoneno	3.8	251	204	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
Óxido de <i>cis</i> -linalol	0.2	273	322	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
Óxido de <i>trans</i> -linalol	0.2	281	336	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
Linalol	3.7	289	377	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR

Fenchol	0.2	293	391	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
Camfolenal	0.4	296	345	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
<i>Trans</i> -Pinocarveol	0.7	306	424	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
<i>Trans</i> -Verbenol	2.2	310	437	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
Pinocarvona	0.4	313	380	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
Bomeol	0.3	319	447	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
Terpinen-4-ol	0.2	325	398	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
Mirtenal	0.4	329	409	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
$\alpha$ -terpineol	0.6	332	446	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
Myrtenol	0.6	335	490	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
Verbenona	0.9	337	451	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
<i>Trans</i> -Carveol	0.3	345	512	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
Isobutirato de bencilo	0.1	379	486	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
$\beta$ -elemeno	tr	437	394	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
$\beta$ -selineno	1.3	483	454	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
$\alpha$ -selineno	0.4	488	456	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
Óxido de $\beta$ -cariofileno	0.9	527	577	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS, <sup>13</sup> C-NMR
Viridiflorol	0.1	533	627	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
Cubenol	0.1	549	619	RI <sub>1</sub> , RI <sub>2</sub> , GC-MS
Myrceno	tr	-	180	RI <sub>2</sub> , GC-MS
Isobutirato de <i>cis</i> -3-hexenilo	tr	-	298	RI <sub>2</sub> , GC-MS
$\alpha$ - <i>p</i> -dimetilestireno	tr	-	320	RI <sub>2</sub> , GC-MS
Mentona	tr	-	334	RI <sub>2</sub> , GC-MS
<i>allo</i> -aromadendreno	0.1	-	417	RI <sub>2</sub> , GC-MS
Pulegona	tr	-	418	RI <sub>2</sub> , GC-MS
Geraniol	tr	-	517	RI <sub>2</sub> , GC-MS
<i>p</i> -cimen-8-ol	0.1	-	519	RI <sub>2</sub> , GC-MS

**Total de identificación**

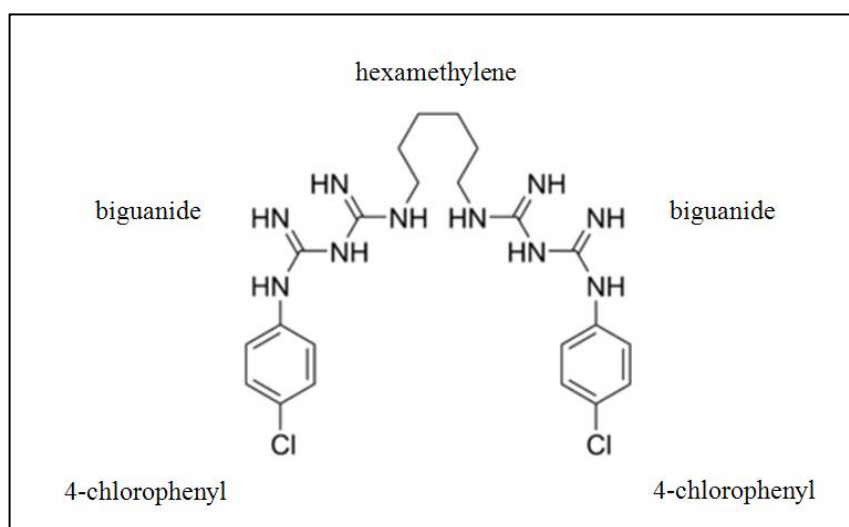
**93.6**

Leyenda:	
Tr	: Trazas $\leq 0.05\%$
IR <sub>1</sub>	: Índice de retención en metilsilicona SE-30
IR <sub>2</sub>	: Índice de retención en Supelcowax™10

## 3.2.2 Clorhexidina

### 3.2.2.1 Descripción

La clorhexidina es una molécula bicatiónica simétrica, es un dímero proguanil por lo que se dice que es una bisguanida, conectada por una cadena central hexametileno. En cada extremo se enlaza un radical paraclorofenil (2 anillos 4 clorofenil), resultando su nombre completo: paraclorofenilbiguanida<sup>22,23</sup>.



**Figura 6: Estructura de la Clorhexidina**<sup>24</sup>

Este compuesto es una base fuerte dicatiónica a pH superior a 3.5 con dos cargas positivas en cada extremo del puente hexametileno. Es esta naturaleza dicatiónica que la hace extremadamente interactiva con los aniones, lo

que es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios colaterales y dificultad para formularla en productos. Aunque es una base, la clorhexidina se mantiene más estable en forma de sal y la preparación más común es la sal de digluconato por su alta solubilidad en agua<sup>23</sup>.

Clorhexidina fue desarrollada en la década de los 40 por Imperial Chemical Industries en Inglaterra, por científicos que realizaban estudios sobre la malaria. Los investigadores fueron capaces de desarrollar compuestos denominados polibiguanidas, que demostraron tener amplio espectro antibacteriano; salió al mercado en 1954 como antiséptico para heridas de la piel, posteriormente se usó en medicina y cirugía. En odontología se utilizó inicialmente como antiséptico bucal y en tratamientos de endodoncia. El estudio definitivo que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia fue realizado por Loe y Schiott en 1970, demostrando que un enjuague de 60 segundos dos veces al día con solución de gluconato de clorhexidina al 0,2% en ausencia de cepillado normal, inhibía la formación de placa y consecuentemente, desarrollo de gingivitis<sup>22,23,25-27</sup>.

#### **3.2.2.2 Propiedades**

Clorhexidina es un eficaz antiséptico de amplio espectro frente a microorganismos de la placa bacteriana. Su acción es rápida y mantiene su efecto durante largo período, liberándose en forma gradual por difusión en la cavidad oral hasta por 24 horas, según vaya disminuyendo la concentración de clorhexidina en la saliva, evitando así la posible recolonización bacteriana en cavidad oral. Debido a su carga positiva, se adsorbe, durante el enjuague oral, en la superficie de los dientes, placa y mucosa oral, que tienen una carga neta negativa, formando un sistema de liberación sostenida. La Clorhexidina actúa a distintos niveles: Elimina la estructura de la placa bacteriana existente, inhibe la adhesión de proteínas muco-salivares, inhibe la formación de nueva placa bacteriana y destruye microorganismos responsables de formación de placa dental. En bajas concentraciones es bacteriostática y en las elevadas es bactericida. La baja absorción de clorhexidina es un factor en su baja toxicidad. Se metaboliza en el organismo, absorbiéndose débilmente por la mucosa del tracto digestivo, eliminándose por las heces el 90% del fármaco absorbido y el resto lo hace por orina. No se acumula en el organismo ni se metaboliza en sustancias lesivas<sup>22,26</sup>.

La clorhexidina se usa, en la mayoría de casos, para tratamiento de enfermedades periodontales; al actuar como

agente bacteriostático o bactericida, actuando sobre bacterias cariogénicas. La clorhexidina es el agente antimicrobiano bucal más usado, efectivo e investigado en eliminar o disminuir el *Streptococos mutans* en procesos dependientes de este microorganismo <sup>28</sup>.

La clorhexidina 0.12% presenta efecto inhibidor significativo en la actividad de las enzimas proteolíticas que generan caries dentinaria <sup>29</sup>.

Investigaciones realizadas muestran que la inhibición importante del crecimiento de *Streptococcus mutans* y la incapacidad siguiente de crecer como placa bacteriana en presencia de sacarosa ocurría después de un régimen de exposición escalonado a clorhexidina inicialmente y luego a xilitol <sup>30</sup>.

Se ha reportado también que los barnices de clorhexidina son capaces de reducir los niveles de *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* y la gingivitis, mejorando la salud oral del paciente <sup>31</sup>.

### **3.2.2.3 Mecanismo de acción**

Clorhexidina se une fuertemente a la membrana celular bacteriana, lo que a bajas concentraciones produce aumento de la permeabilidad con filtración de componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático). En concentraciones altas produce precipitación del citoplasma

bacteriano y muerte celular (efecto bactericida). En boca se adsorbe rápidamente a las superficies de contacto, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita. Los depósitos de clorhexidina se forman por la interacción reversible de la molécula de clorhexidina con grupos fosfato, sulfato y carboxilo de los tejidos blandos y duros. La clorhexidina adsorbida se libera gradualmente en 8-12 horas en su forma activa. Después de 24 horas aún pueden recuperarse concentraciones bajas de clorhexidina, lo que evita la colonización bacteriana durante ese tiempo. Su pH óptimo se encuentra entre 5.5 y 7.0; en función de éste ejerce su acción frente a diferentes bacterias. Con un pH entre 5.0 y 8.0, es activa frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los estreptococos orales transportan azúcares a través del sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa. La clorhexidina incluso en baja concentración, inhibe este sistema; esto podría explicar el hecho de que a bajas concentraciones, clorhexidina puede reducir la producción de ácido a partir de glucosa por estreptococos orales sin afectar su viabilidad celular<sup>22-25</sup>.

La clorhexidina previene la formación de placa por medio de los siguientes pasos:

- a) Bloquea grupos de ácidos libres de las glicoproteínas salivales (mucinas), que forman la película adquirida

que permitirá la formación de placa bacteriana, siendo ésta su primera capa, no permitiendo la formación de la misma.

- b) La carga iónica positiva de la clorhexidina atrae a la superficie microbiana de carga negativa, para lo que contribuye el pH del medio, que es neutro o básico, permitiendo a los microorganismos unirse a las moléculas de clorhexidina y no se adhieran a la película adquirida. La clorhexidina actúa sobre la membrana de microorganismos produciendo cambios electroforéticos que actúan sobre las bacterias produciendo precipitación de iones potasio y fosfato. A mayor concentración de clorhexidina se produce una precipitación plasmática de los microorganismos, causándoles la muerte, lo que le confiere efecto bactericida.
- c) La clorhexidina también destruye la placa formada al competir con el ión calcio, factor coadyuvante de la formación y crecimiento de placa bacteriana que actúa como molécula de enlace que permite a las bacterias fijarse a la película adquirida sin impedimentos. Cuando la clorhexidina se une al ión calcio, impide la unión del mismo a las bacterias.
- d) A altas concentraciones la clorhexidina produce tras unirse a la pared bacteriana, cambios electroforéticos



que causan precipitación citoplasmática que conlleva la muerte celular<sup>23</sup>.

#### 3.2.2.4 Presentaciones

La clorhexidina se puede encontrar en diversas presentaciones, así tenemos:

- a) **Colutorios:** es la más utilizada, su forma de presentación común es en solución al 0.12% para enjuagues de 15 ml durante 30 segundos y al 0.2% para enjuagues de 10 ml.
- b) **Dentífricos:** es difícil formular la clorhexidina en una pasta dental.
- c) **Geles:** en comparación con el colutorio, el gel muestra mayor control en la inflamación gingival debido a mayor adherencia a la superficie dental y mucosa; su uso no sólo se justificaría en el control de enfermedad periodontal, sino también como antiséptico de acción localizada.
- d) **Barnices:** El barniz de clorhexidina presenta eficacia probada en la reducción de *Streptococcus mutans*. Además, se reducen los efectos secundarios como alteraciones del gusto y el sabor amargo, así como la ausencia de lesiones mucosas al ceñirse la aplicación a la superficie dentaria disminuyendo el contacto con superficies mucosas.

- e) **Aerosoles:** Presentación más usada en pacientes con discapacidad física y psíquica, por la comodidad de aplicación por parte de familiares.
- f) **Irrigaciones:** Con irrigaciones pulsátiles al 0.06% sólo se obtienen resultados transitorios con ventaja de ser agradable para el paciente. La irrigación del surco gingival con agua reduce el número de microorganismos, al adicionar agentes antimicrobianos se consigue disminuir aún más el número de microorganismos.
- g) **Chicles con clorhexidina:** se ha demostrado su eficacia consiguiendo reducción significativamente mayor de índices de placa y gingivitis que los chicles placebo y similares resultados a 2 enjuagues diarios con clorhexidina. A demás los chicles presentan ventaja de producir menor tinción en dientes y superficies orales <sup>23</sup>.

### 3.2.3 *Streptococcus mutans*

#### 3.2.3.1 Clasificación

Esta especie bacteriana presenta la siguiente clasificación taxonómica: <sup>32</sup>

DOMINIO	: Bacterias
PHYLUM	: Firmicutes
CLASE	: Bacilli
ORDEN	: Lactobacillales
FAMILIA	: Streptococcaceae
GÉNERO	: Streptococcus
ESPECIE	: <i>Streptococcus mutans</i>

#### 3.2.3.2 *S. mutans* y Grupo Mutans

La especie *Streptococcus mutans* se ubica dentro de un conjunto de bacterias denominado “Grupo Mutans”, los cuales presentan diversidad genética, antigénica y bioquímica; también, comparten rasgos fenotípicos como fermentación del manitol y sorbitol, producción de glucanos

extracelulares a partir de sacarosa, ciertos morfotipos coloniales al ser cultivados en agar con sacarosa y la inducción de caries a partir del consumo de carbohidratos (sobre todo sacarosa) por parte del huésped <sup>33</sup>.

El grupo mutans está conformado por las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. downei*, *S. macacae* y *S. ferus*. La primera diferenciación de las distintas cepas se efectuó a partir de su perfil de producción de bacteriocinas; posteriormente se encontró que existían ocho grupos serológicos en las especies del grupo mutans. Los dos grandes subgrupos presentan respectivamente los serotipos *c/e/f* (correspondiente a *S. mutans*) y *d/g* (*S. sobrinus*). Las especies del grupo mutans predominantes en la boca de la mayoría de los sujetos corresponden al *S. mutans*, mientras que el *S. sobrinus* aparece en menos individuos y en cantidades menores<sup>34</sup>.

El *Streptococcus mutans* presenta el serotipo *c*, que es el más frecuente en la colonización inicial, que se produce en función de características particulares de la saliva de cada individuo <sup>35,36</sup>.

### **3.2.3.3 Descripción**

*S. mutans* es un coco Gram positivo, que se dispone en pares o cadenas cortas; es anaerobio o aerobio facultativo, ya que para desarrollarse necesita medios enriquecidos y

ambientes de microaerofilia o anaerobiosis, con una tensión de CO<sub>2</sub> al 10%. Posee los polisacáridos antigénicos definidos para los serotipos c, e y f, siendo el serotipo c el más predominante de la cavidad oral en humanos <sup>37-39</sup>.

#### **3.2.3.4 Estructura celular**

El *Streptococcus mutans* tiene una pared celular gruesa, ésta se compone de peptidoglicano (mureína) y ácidos teicoicos que impiden la lisis osmótica del protoplasto celular y le confieren rigidez y forma. Presenta proteínas fijadoras de glucanos, que intervendrían en la adhesión a la película adquirida, cuando en ella existen glucanos adsorbidos, y en los procesos de agregación bacteriana. Posee proteínas parietales superficiales, que pueden liberarse al medio en el curso de crecimiento bacteriano, y se comportan como adhesinas; son conocidas como antígenos I/II, y medirían la adhesión a la película adquirida en ausencia de glucanos en su superficie y la coagregación con otras bacterias. El papel que desempeñan sus fimbrias y ácidos lipoteicoicos en los procesos de adhesión a tejidos del hospedador y en los de agregación bacteriana es controvertida. El *S. mutans* se compone de ADN circular y tiene por lo menos tres estrechamente relacionados, pero diferentes plásmidos. El tamaño de estos plásmidos son similares, de aproximadamente 5,6 kilobases (kb). Estos

son importantes para *S. mutans* debido a sus funciones, incluyendo la resistencia a ciertos antibióticos o metales pesados; la producción de bacteriocina y la inmunidad, las vías catabólicas de accesos y los mecanismos para la conjugación como las actividades de transferencia <sup>37,40</sup>.

### 3.2.3.5 Factores de virulencia

Los factores de virulencia son los que promueven la colonización e invasión en tejidos, haciendo que las bacterias alcancen altos niveles de población antes que se vean limitadas por la respuesta del hospedero. En el caso del *S. mutans*, tenemos los siguientes: <sup>41,42</sup>

- **Acidogenicidad:** *S. mutans* es capaz de fermentar diversos azúcares, particularmente manitol y sorbitol. En medios ricos en carbohidratos se genera ácido láctico como producto final del metabolismo, el cual se ha asociado con el origen de caries.
- **Aciduricidad:** es la tolerancia al ácido, que le permite mantener una capacidad glicolítica a niveles bajos de pH (pH 4.4), donde el crecimiento de otras especies está inhibido.
- **Acidofilicidad:** *S. mutans* puede resistir la acidez del medio bombeando protones ( $H^+$ ) fuera de la célula.
- **Síntesis de polisacáridos extracelulares:** A partir de la fermentación de hidratos de carbono, principalmente de

la sacarosa, el *S. mutans* puede sintetizar polisacáridos extra celulares como glucanos (dextrán y leván) y fructanos, que promueven la adherencia selectiva y acumulación de un amplio número de estreptococos cariogénicos en los dientes, además de aumentar la porosidad y dimensión de la matriz de la placa dental. Esto permite una mayor difusión de sustrato a través de la superficie del esmalte, se produce un descenso de los valores de pH en capas más profundas de la placa y se favorece el desarrollo de la caries.

- **Síntesis de polisacáridos intracelulares:** como el glucógeno, que puede ser degradado por dextranasas, fructanasas y glucógenofosforilasas. Sirve como reserva alimenticia y mantiene la producción de ácido durante largos periodos aún en ausencia de consumo de azúcar.

#### **3.2.3.6 Hábitat**

El principal hospedador del *S. mutans* es la boca del hombre, puede desarrollarse en temperaturas que van desde 18 a 40 °C. Coloniza especialmente las superficies duras de la cavidad oral (esmalte o cemento); se han obtenido también aislamientos a partir de heces humanas. El *S. mutans* induce lesiones cariosas tanto de superficies lisas, de fosas y fisuras, como en zonas interproximales y cemento radicular. A nivel extraoral, el *S. mutans* está

relacionado con endocarditis subagudas y raramente con otros procesos patológicos <sup>37</sup>.

### **3.2.4 Fitoterapia**

#### **3.2.4.1 Definición**

Ciencia que estudia el uso de los productos de origen vegetal con finalidad preventiva y de tratamiento <sup>43</sup>.

#### **3.2.4.2 Usos de la Fitoterapia**

El uso de la fitoterapia se ha dado desde épocas muy antiguas, el hombre ha buscado distintos remedios para aliviar sus padecimientos, los primeros remedios que usaron; debido a su variedad, abundancia y múltiples propiedades, fueron las plantas.

En la actualidad, Aproximadamente el 80 % de la población de la mayor parte de países en desarrollo todavía usan la medicina tradicional, derivada de plantas para tratar enfermedades en humanos. Países como China, Cuba, Sri-Lanka, Tailandia y otros han inscrito oficialmente en sus programas de salud el uso de la medicina tradicional, por ejemplo, la homeopatía que depende de material vegetal o sus derivados para tratar dolencias en humanos <sup>44</sup>.



La fitoterapia actual se considera una terapéutica suave, no agresiva, que utiliza principalmente productos con actividad moderada, con márgenes terapéuticos relativamente amplios; se considera especialmente útil en el tratamiento de afecciones leves o moderadas, y afecciones crónicas <sup>43</sup>.

La Organización Mundial de la Salud reconoce la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, como también, la relevancia a nivel económico al ser una fuente de descubrimiento de nuevas drogas que en algunos casos tiene costo inferior a la síntesis de nuevos fármacos. El interés científico sobre plantas medicinales, investigando su riqueza y variabilidad química, ha impulsado la revalorización de su empleo en muchas partes del mundo, representando una forma complementaria de curar; el empirismo de la terapia queda atrás en función de la evidencia científica, armonizando la medicina tradicional con las terapias de cada país <sup>45</sup>.

### **3.3 Definición de términos básicos**

- ✓ **Actividad Antibacteriana:** La actividad antimicrobiana se define como la capacidad de matar, inhibir y/o inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena <sup>46</sup>.

- ✓ **Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** Es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 10<sup>5</sup> bacterias en 1 mL de medio de cultivo, tras 18-24 h de incubación. Se clasifica la sensibilidad de un germen frente a un antibiótico en función de su CMI <sup>47</sup>.
- ✓ **Concentración Mínima Bactericida (CMB):** Es la menor concentración capaz de destruir o matar 10<sup>5</sup> bacterias en 1 mL de medio de cultivo, tras 18-24 h de incubación <sup>48</sup>.

### 3.4 Hipótesis y variables

- ✓ **Hipótesis:**

“Existe actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans*”

- ✓ **Variables:**

- Variables del Estudio:

- Variable Independiente: Aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” en diferentes concentraciones.
- Variable Dependiente: Actividad antimicrobiana (mediante los halos de inhibición frente a la cepa *Streptococcus mutans*)

### 3.5 Operacionalización de variables

VARIABLE	CONCEPTUALIZACIÓN	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA	CATEGORÍA
Actividad antibacteriana frente a <i>Streptococcus mutans</i>	Capacidad de ciertas sustancias químicas, producidas por un ser vivo o derivadas sintéticamente de él, que matan o impiden el crecimiento de bacterias sensibles a ellas.	Concentración Mínima Inhibitoria	Efecto en 10%	Nominal	Sí No
			Efecto en 50%	Nominal	Sí No
			Efecto en 100%	Nominal	Sí No
		Grado de Sensibilidad del <i>Streptococcus mutans</i> frente al Aceite esencial de <i>Luma chequen</i>	Diámetro de los Halos de Inhibición (mm)	Intervalo	6mm = R >6mm = S
Aceite Esencial de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray “arrayán” en diferentes concentraciones	Mezcla de sustancias químicas biosintetizadas por la planta que contiene fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, importantes en la industria cosmética, alimentaria y farmacológica.	-----	Concentración del Aceite Esencial de <i>Luma chequen</i>	Ordinal	10% 50% 100%

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1 Tipo de investigación

El análisis del estudio pertenece al tipo:

- **Experimental:** porque el investigador controla la acción de una variable sobre otra.
- **Prospectivo:** debido a que el registro de la información se realizará después de efectuado el experimento.
- **Transversal:** porque la información se obtendrá en un sólo momento.
- **In vitro:** porque el estudio se realizará dentro de un laboratorio.

### 4.2 Población y muestra

Se trabajó con cepas estándares de *Streptococcus mutans* provenientes de American Type Culture Collection (ATCC) 25175, de las cuales se seleccionaron 5 colonias que cumplieron con las condiciones de estar bien aisladas y ser del mismo tipo morfológico; y con aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”, el cual se obtuvo en el Centro de Investigación de Plantas Medicinales Aromáticas y Medicina Tradicional CIPLANT.

### **4.3 Procedimientos y técnicas**

#### **4.3.1 Obtención del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”**

El material de hojas se trató por hidrodestilación (HD) con arrastre de vapor de agua. Las ventajas son su simplicidad, bajo costo y el hecho de maniobrar grandes volúmenes de materia prima. Este método se fundamenta en que los aceites esenciales son arrastrados por la corriente de vapor de agua que se genera en la fuente de vapor, luego esta mezcla (vapor de agua y aceite) es condensada en un refrigerante de vidrio, se separa el aceite del agua por simple diferencia de densidades.

Aproximadamente de 5 Kg de hojas secas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” de la muestra seca fueron sometidas a extracción, por el método de arrastre por vapor de agua. Una vez destilado se separó por diferencia de densidades, utilizando una pera de decantación, se deshidrató con sulfato de sodio anhidro, se filtró, y este filtrado fue el aceite esencial puro, se guardó en frasco de vidrio de color ámbar bajo refrigeración.

#### 4.3.2 Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial frente a *Streptococcus mutans*

➤ **Método de Disco - Difusión en Agar: Fundamento** <sup>49</sup>

Este método representa la prueba de susceptibilidad más utilizada en bacteriología clínica, permite obtener resultados exactos mediante un procedimiento estandarizado, sencillo, de ejecución rápida, económico y reproducible. Se utiliza en el estudio de la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido la que se evidencia con la formación de halos de inhibición.

➤ **Microorganismo:**

Bacteria Gram Positiva: *Streptococcus mutans* ATTC 25175

➤ **Control Positivo:**

Clorhexidina al 0.12%

➤ **Control Negativo:**

Dimetil sulfóxido A.R. (DMSO)

➤ **Muestra:**

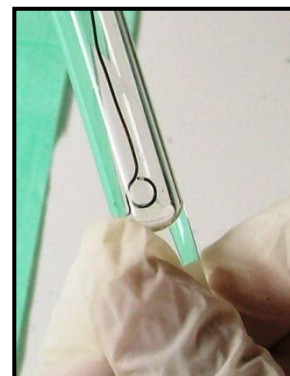
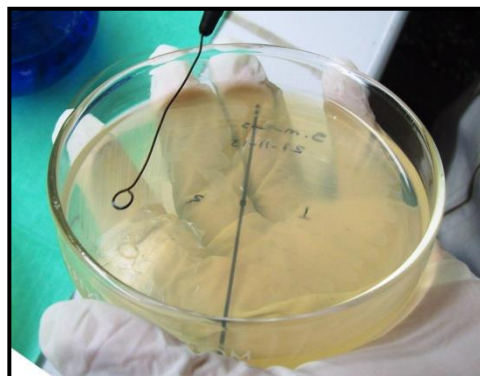
Aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” en concentraciones de 100, 50 y 10 por ciento. Utilizándose como diluyente el Dimetil sulfóxido A.R.

➤ **Reconstitución de la cepa: (Inóculo)** <sup>49</sup>

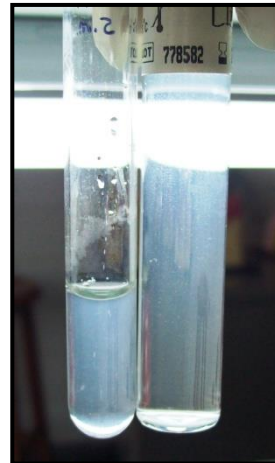
- A partir del cultivo puro del *Streptococcus mutans*, con un desarrollo de 24 horas en placa de Tripticasa Soya Agar (TSA), se seleccionaron 5 colonias bien aisladas y del mismo tipo morfológico.



- Se tomaron 5 colonias seleccionadas con un asa de siembra estéril y se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía 5 mL de caldo Müller-Hinton.



- Se incubó el caldo a una temperatura entre 37 °C por 6 horas en microaerofilia, hasta obtener una turbidez final equivalente al 0,5 de la escala de Mc Farland, que corresponde a  $10^8$  UFC/mL.

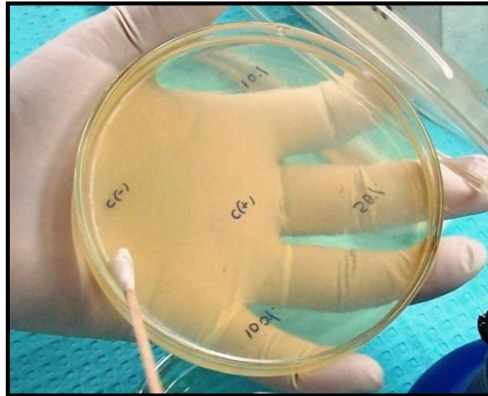


➤ **Sembrado de la cepa en Agar:** <sup>49</sup>

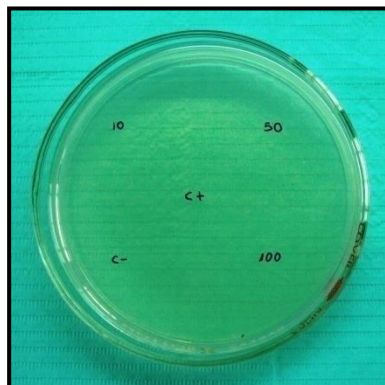
La cepa reconstituida se sembró en 14 placas petri que contenían Agar Müller-Hinton con la técnica de difusión, de la siguiente manera:

- Se sumergió un hisopo de algodón estéril en el inóculo, se rotó el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso del inóculo.
- Se inoculó la superficie seca de la placa de Müller-Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo sobre la placa.





- Se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.



#### ➤ **Dilución del Aceite esencial:**

El aceite esencial puro se diluyó con Dimetil sulfóxido A.R. en tubos de ensayo, de tal forma que se obtuvieron tres concentraciones correspondientes a 100, 50 y 10 %.



➤ **Discos de papel:**

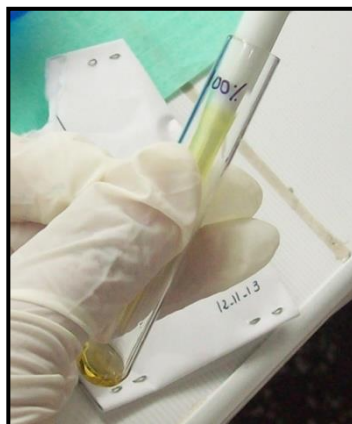
Los discos de papel tuvieron un diámetro de 6mm y un espesor de 0.02mm.



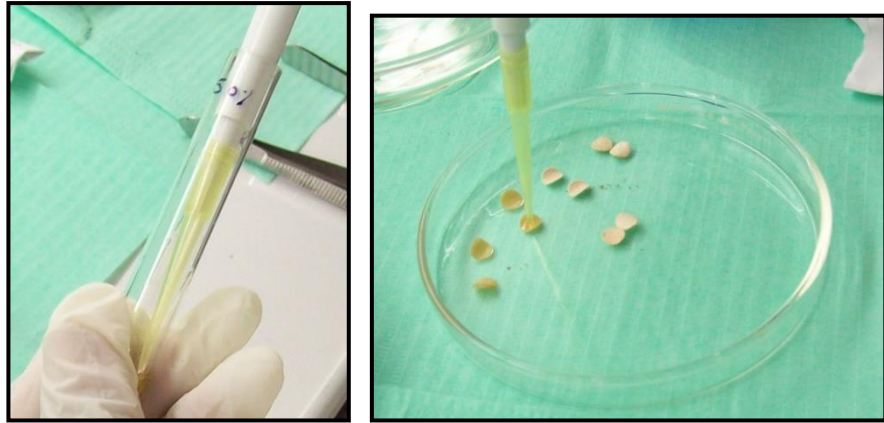
➤ **Inoculación de la muestra:**

Los discos de papel fueron enumerados del 1 al 5 y utilizando una micropipeta, se procedió de la siguiente manera:

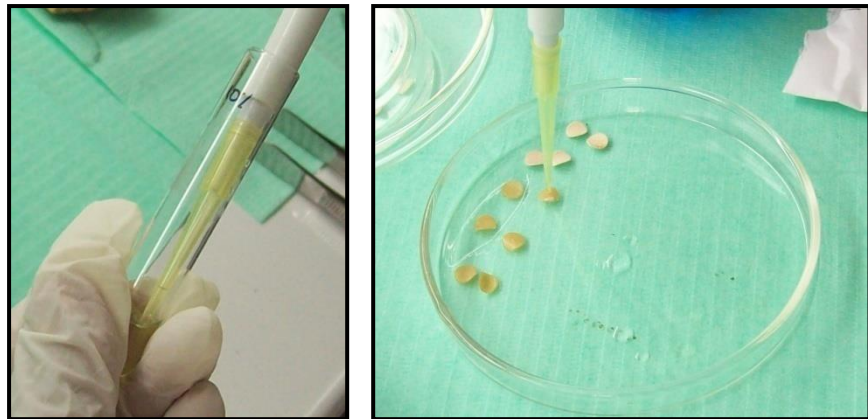
- Disco 1: se inoculó 10uL del aceite esencial al 100 %



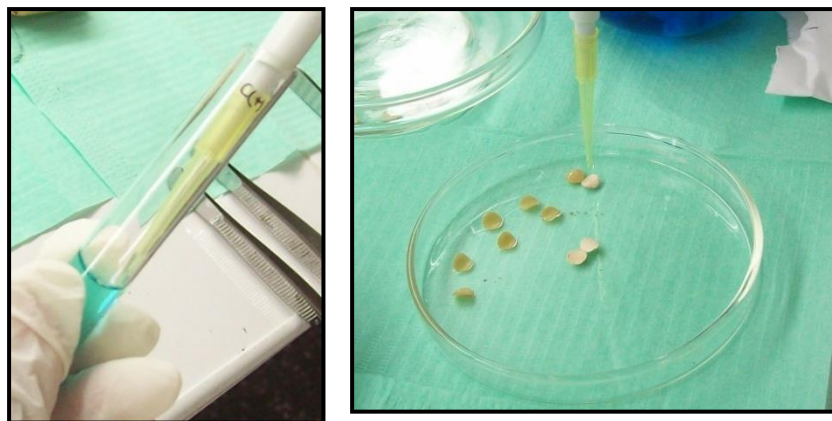
- Disco 2: se inoculó 10uL del aceite esencial al 50 %



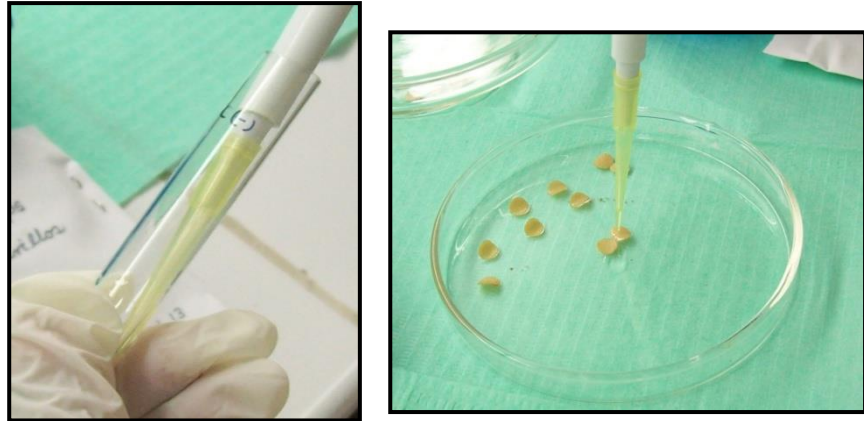
- Disco 3: se inoculó 10uL del aceite esencial al 10 %



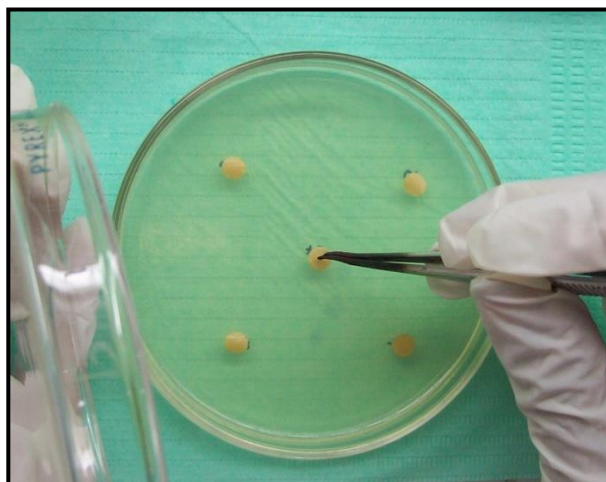
- Disco 4: se inoculó 10uL de Clorhexidina al 0.12 %



- Disco 5: se inoculó 10uL de Dimetil sulfóxido A.R.

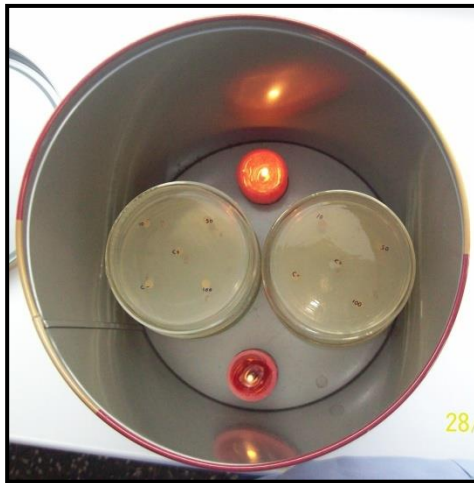


Luego se colocaron cada uno de los discos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. Los discos estuvieron a una distancia mínima de 25mm uno del otro.



➤ **Incubación de la muestra:**

Se cubrieron las placas petri, se colocaron en la incubadora en posición invertida y se procedió a incubación en un ambiente de microaerofilia a 37 °C por 24 horas.



#### 4.4 Procesamiento de datos

- La acción antibacteriana del aceite esencial fue cuantificada en milímetros, midiendo los diámetros de los halos de inhibición completa (incluyendo el diámetro de los discos), utilizando un calibrador digital.
- Se mantuvo iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro.



- Los diámetros de los halos de inhibición obtenidos de cada una de las placas fueron anotados en la ficha de recolección de datos.
- La CIM se consideró como la menor concentración del aceite esencial capaz de inhibir el desarrollo bacteriano.
- La interpretación de los resultados se realizó de la siguiente manera: <sup>50</sup>
  - La falta de desarrollo alrededor del disco indica que la bacteria es “S, sensible” al aceite esencial estudiado, lo que significa que puede utilizarse como antimicrobiano en dosis terapéuticas.
  - El crecimiento del microorganismo alrededor del disco indica que es “R, resistente” al aceite esencial estudiado, por lo cual no debe utilizarse como antimicrobiano.

#### **4.5 Análisis de resultados**

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software STATA Versión 12.

## V. RESULTADOS

Se realizaron 14 ensayos válidos para cada concentración del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”, donde se obtuvieron los resultados observados en la Fig. 7. Las mediciones de los halos de inhibición fueron registrados en la ficha de recolección de datos, que se observa en la Tabla 2.

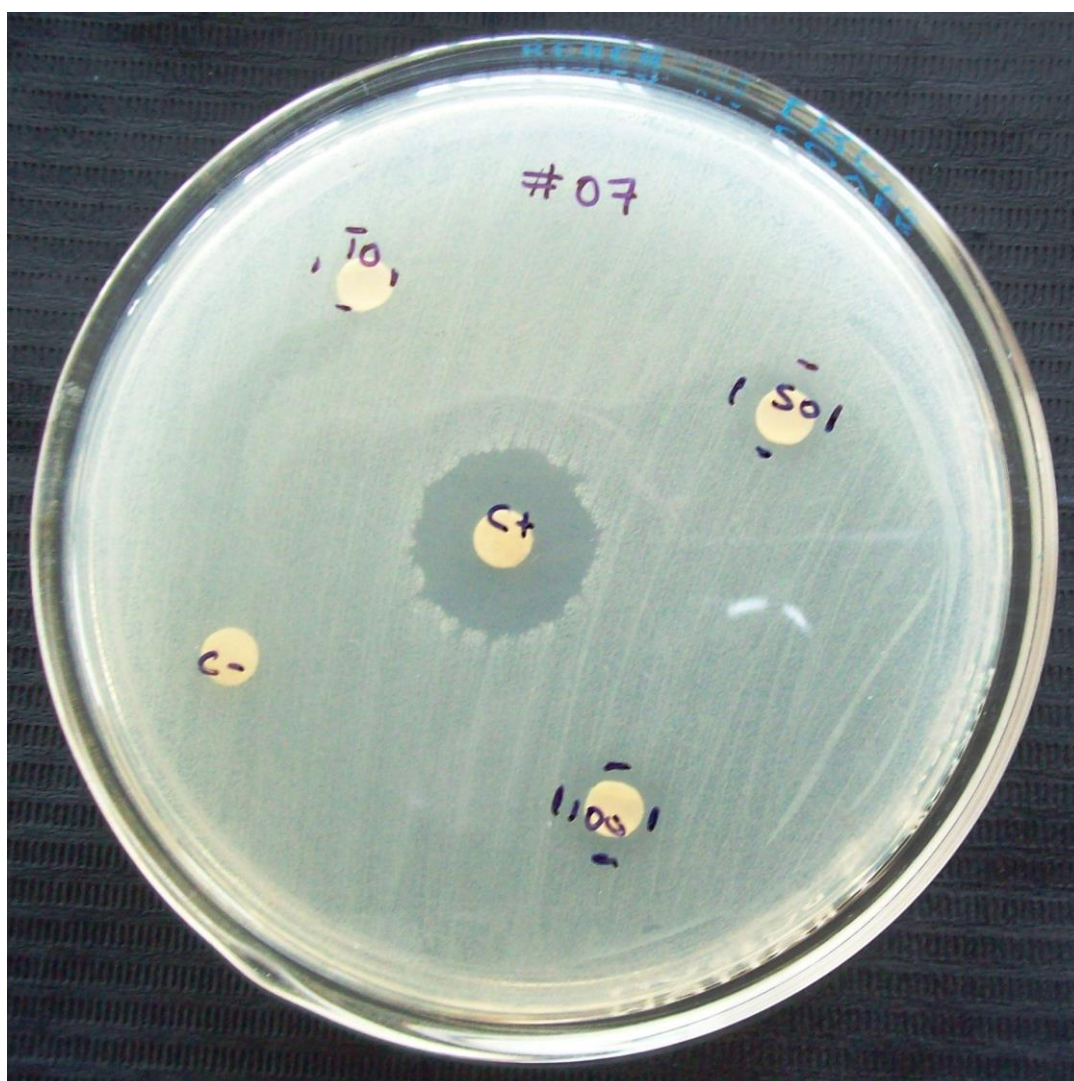


Figura 7: Formación de halos de inhibición en *Streptococcus mutans* ATCC 25175

**Tabla 2: Mediciones de los halos de inhibición**

		Concentración del Aceite Esencial de <i>Luma Chequen</i>			Clorhexidina 0.12%	Dimetil sulfóxido
		10%	50%	100%	C (+)	C (-)
HALO DE INHIBICION EN (mm)	Placa Nº 1	6,01	7,83	8,14	15,97	6
	Placa Nº 2	6,13	7,55	8,66	16,75	6
	Placa Nº 3	6,5	8,62	8,65	16,76	6
	Placa Nº 4	6,08	7,35	8,16	17,65	6
	Placa Nº 5	6,22	8,12	9,11	16,74	6
	Placa Nº 6	6,01	7,06	8,27	15,67	6
	Placa Nº 7	7,75	9,54	9,65	16,91	6
	Placa Nº 8	6,01	7,96	8,29	15,31	6
	Placa Nº 9	6,01	7,07	8,06	16,8	6
	Placa Nº 10	6,18	7,3	8,57	16,78	6
	Placa Nº 11	6,14	7,62	8,39	15,9	6
	Placa Nº 12	6,01	7,63	9,09	16,31	6
	Placa Nº 13	6,33	8,39	9,18	15,57	6
	Placa Nº 14	6,53	8,31	8,95	16,64	6



Con los datos obtenidos se procedió al análisis estadístico de la siguiente manera:

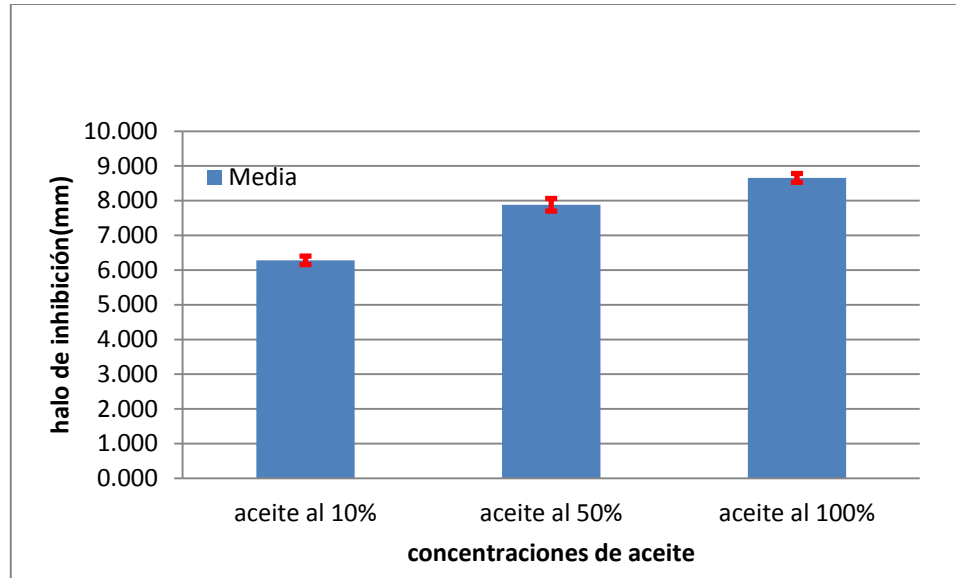
Se realizó la prueba de normalidad para los halos de inhibición de cada una de las concentraciones con la finalidad de demostrar que estos tienen una distribución normal ( $P \geq 0.05$ ) al 95% de nivel de confianza. Se encontró que el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” en concentraciones de 50 y 100% presentan distribución normal ( $P \geq 0.05$ ), mientras que la concentración del aceite al 10% no presenta distribución normal ( $P < 0.05$ ).

### 5.1 Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans*

**Tabla 3: Halo de inhibición promedio según diferentes concentraciones del aceite**

<b>Grupo</b>	<b>N°</b>	<b>Media</b>	<b>D.S.</b>	<b>Mediana</b>	<b>Coef.Variac.</b>
<b>Aceite 10%</b>	14	6.28	0.46	6.14	0.07
<b>Aceite 50%</b>	14	7.88	0.68	7.73	0.09
<b>Aceite 100%</b>	14	8.66	0.48	8.61	0.06

**Grafico 1: Halo de inhibición promedio según diferentes concentraciones del aceite**



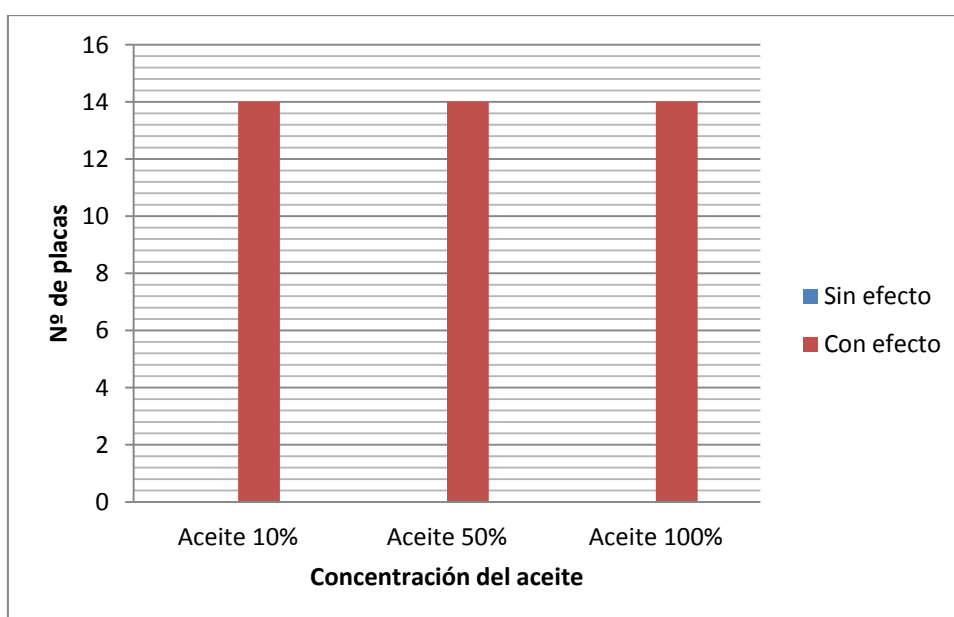
Los halos de inhibición de mayor diámetro se presentan en la concentración del aceite al 100%, con una media de 8.66 y mediana de 8.61 mm; le sigue la concentración del aceite al 50%, con una media de 7.88 y mediana de 7.73 mm; por último, la concentración del aceite al 10% presenta los halos de inhibición de menor tamaño, con una media de 6.28 y mediana de 6.14 mm.

## 5.2 Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans*

**Tabla 4: Efecto de las diferentes concentraciones del aceite frente al *Streptococcus mutans***

Concentración del aceite	Sin efecto		Con efecto		Total
	N°	%	N°	%	
10%	0	0	14	100	14
50%	0	0	14	100	14
100%	0	0	14	100	14

**Gráfico 2: Efecto de las diferentes concentraciones del aceite frente al *Streptococcus mutans***



Todas las concentraciones del aceite 10, 50 y 100% presentan efecto frente al *Streptococcus mutans*

### 5.3 Comparación del efecto del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*

Dado que una de las concentraciones del aceite no presenta distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para comparación de más de dos medianas.

**Tabla 5: Prueba de Kruskal Wallis para las tres concentraciones del aceite**

Grupo	N°	Suma-rango	X <sup>2</sup>	P
Aceite 10%	14	112.0	30.13	0.01
Aceite 50%	14	325.5		
Aceite 100%	14	465.5		

Utilizando la prueba de Kruskal Wallis se observa que existen diferencias significativas entre las tres concentraciones del aceite (al menos dos concentraciones difieren,  $P < 0.05$ ).

Para evaluar entre quienes existen diferencias significativas, se comparó por pares de medianas utilizando la prueba U de Mann Whitney (Suma de rangos de Wilcoxon).

**Tabla 6: Prueba de U de Mann Whitney para comparación de dos concentraciones del aceite**

<b>Aceite</b>	<b>N°</b>	<b>Z</b>	<b>P</b>
<b>10% vs 50%</b>	14	-4.193	< 0.01
<b>10% vs 100%</b>	14	-4.515	< 0.01
<b>50% vs 100%</b>	14	-3.056	< 0.01

El resultado de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon estandarizó a un valor Z, el cual nos muestra que existe diferencias significativas entre todos los posibles pares de concentraciones del aceite esencial ( $P < 0.05$ ).

#### **5.4 Comparación del grado de sensibilidad de *Streptococcus mutans* frente a la clorhexidina al 0.12% y al aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”**

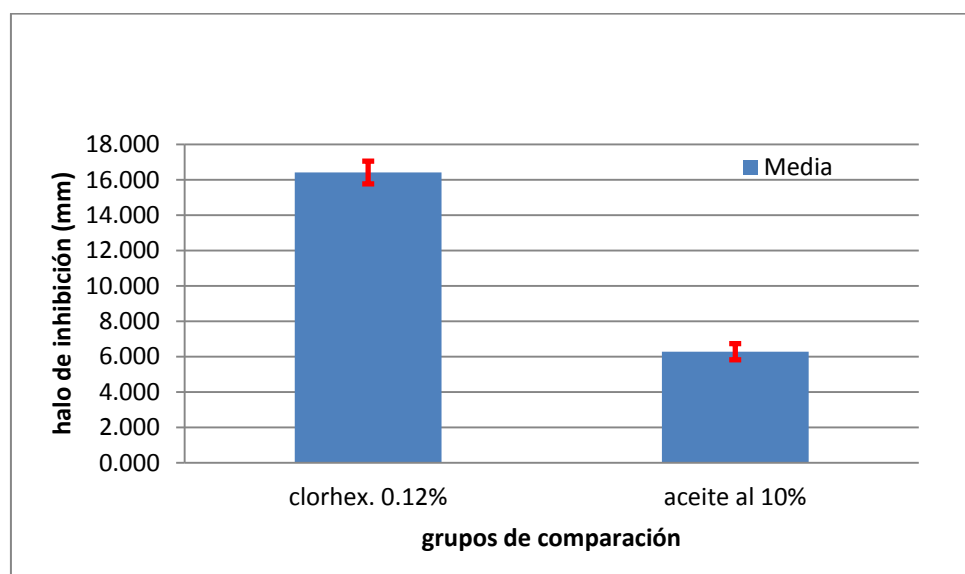
Dado que únicamente el grupo del aceite esencial al 10% no presentó distribución normal y que la diferencia de valores era mínima entre todos los grupos, se utilizó la prueba T de Student para comparar entre pares de medias, con un nivel de significancia de 0.05.

**Tabla 7: Prueba de T de Student comparando Clorhexidina al 0.12% con las tres concentraciones del aceite esencial**

Grupos	Medias (dif)	E.S. (dif)	t	P	IC (95%)
<b>Clorhex vs 10%</b>	10.13	0.21	47.92	< 0.01	9.69 ; 10.57
<b>Clorhex vs 50%</b>	8.53	0.25	34.08	< 0.01	8.02 ; 9.04
<b>Clorhex vs 100%</b>	7.76	0.21	36.16	< 0.01	7.32 ; 8.19

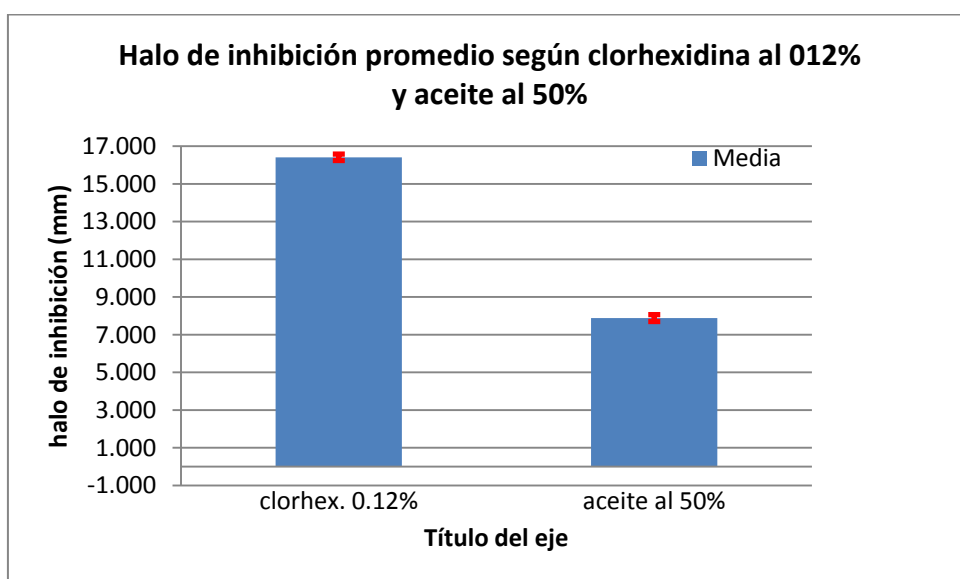
Se utilizó la prueba T de Student para comparar las medias del halo de inhibición entre clorhexidina al 0.12% y cada una de las concentraciones del aceite esencial, encontrando diferencias significativas entre todos los pares de medias ( $P < 0.05$ ), siendo mayor la diferencia entre clorhexidina al 0.12% y aceite al 10% y menor diferencia entre clorhexidina al 0.12% y aceite al 100%.

**Gráfico 3: Halo de inhibición promedio según clorhexidina al 0.12% y aceite esencial al 10%**



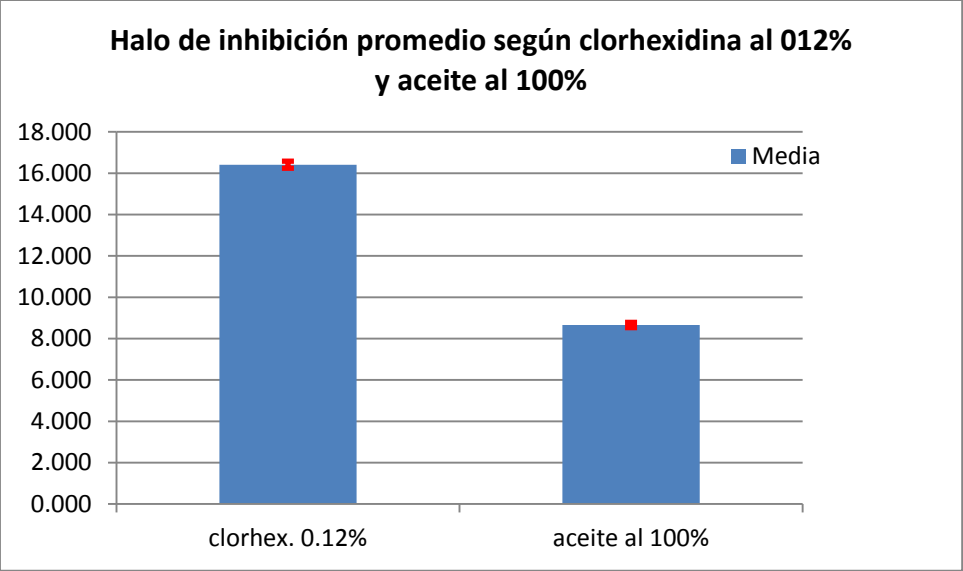
La clorhexidina al 0.12% presenta un halo de inhibición promedio mayor a 16 mm, mientras que el aceite esencial al 10% presenta un halo de inhibición mayor a 6 mm.

**Gráfico 4: Halo de inhibición promedio según clorhexidina al 0.12% y aceite esencial al 50%**



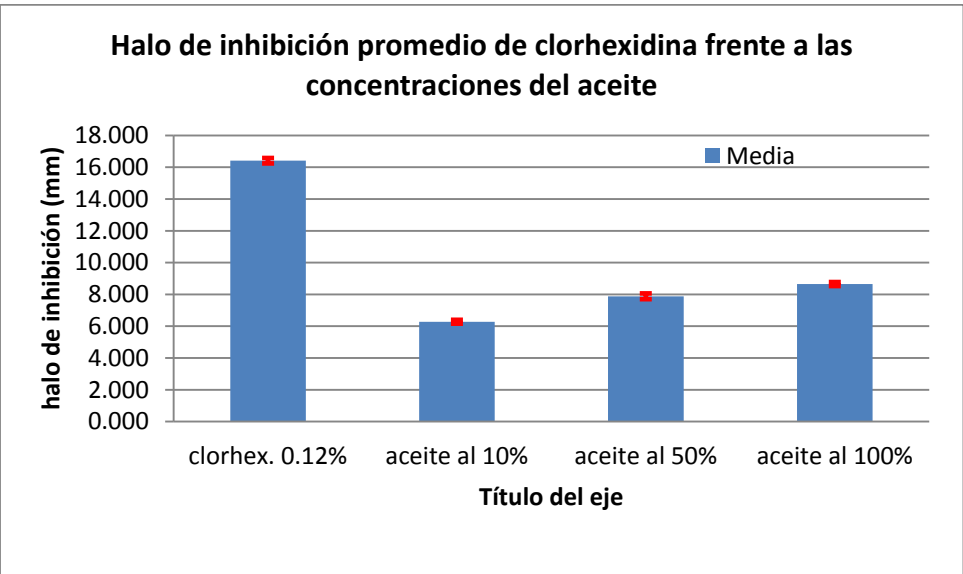
La clorhexidina al 0.12% presenta un halo de inhibición promedio mayor a 16 mm, mientras que el aceite esencial al 50% presenta un halo de inhibición mayor a 7 mm.

**Gráfico 5: Halo de inhibición promedio según clorhexidina al 0.12%  
y aceite esencial al 100%**



La clorhexidina al 0.12% presenta un halo de inhibición promedio mayor a 16 mm, mientras que el aceite esencial al 50% presenta un halo de inhibición mayor a 8 mm.

**Gráfico 6: Halo de inhibición promedio de clorhexidina al 0.12%  
frente a las concentraciones del aceite esencial**





La clorhexidina al 0.12% presenta un halo de inhibición mayor a comparación de las tres concentraciones del aceite esencial, siendo mayor la diferencia entre clorhexidina al 0.12% y aceite al 10%, y menor entre clorhexidina al 0.12% y aceite al 100%.

## VI. DISCUSIÓN

En la actualidad se investigan numerosas plantas con la finalidad de encontrar en ellas componentes antimicrobianos que luego puedan ser utilizados medicinalmente. *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” es una planta que es utilizada en la medicina tradicional por sus múltiples propiedades. En la presente investigación se buscó determinar la actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans*. Los resultados demostraron que existen diferencias significativas con respecto al tamaño de los halos de inhibición ante la presencia de clorhexidina al 0.12% y las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”. A pesar que esta especie vegetal es poco conocida científicamente, ha sido estudiada por algunos investigadores.

Lazo W. (1990) <sup>6</sup> realizó un estudio acerca de la acción antimicrobiana de algunas plantas de uso medicinal en Chile, en la cual utilizó la decocción y los extractos en etanol, acetato de etilo y cloroformo de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”, en la presente investigación se utilizó el aceite esencial. En sus resultados, logró inhibir el desarrollo de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, mientras que en este estudio se observa la actividad antibacteriana sobre la cepa de *Streptococcus mutans*.

Labbé C. y et al (2002) <sup>7</sup> investigaron acerca de los flavonoides bioactivos de *Luma chequen*, utilizando el extracto metanólico de las hojas frescas

encontrando un efecto fungistático. En la presente investigación se encontró efecto antibacteriano utilizando el aceite esencial de *Luma chequen*.

Gonçalves M. y col (2011)<sup>11</sup> realizaron un estudio acerca de la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite comercial disponible de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, donde evaluaron tres bacterias Gram positivas, dos bacterias Gram negativas, dos levaduras y tres hongos. Para evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica utilizaron el método de difusión en disco, la misma que se utilizó en el presente estudio. En su investigación, utilizaron el dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente para diluir el aceite esencial obteniendo concentraciones en un rango de 0.33 a 10 µL/mL, en el presente estudio también se utilizó el DMSO para obtener las tres concentraciones del aceite esencial al 10, 50 y 100 %. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, mientras que en este estudio se realizaron 14 repeticiones. Gonçalves M. y col. Creen que la actividad antimicrobiana que presenta el aceite esencial de *Luma chequen* puede estar asociado con la importante contribución de  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y linalol, que como se indica en este estudio, representan un alto porcentaje en la composición química del aceite esencial.

## VII. CONCLUSIONES

- Existe actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans*.
- La Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a *Streptococcus mutans* se puede observar a partir de la concentración al 10%.
- Las tres concentraciones estudiadas del aceite esencial al 10, 50 y 100% presentan efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans*, siendo la concentración al 100% la que presentó mayor diámetro del halo de inhibición, con una media de 8.66 mm, a comparación de la concentración al 10% que presentó una media de 6.28 mm y la concentración al 50% que obtuvo una media de 7.88 mm.
- El grupo control de clorhexidina al 0.12% mostró diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto a las tres concentraciones del aceite esencial (10, 50 y 100%). Estas concentraciones, a su vez, también mostraron diferencias significativas entre ellas.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Souza F., Gil J. Doença cárie: Nem infecciosa, nem transmissível. RGO, Porto Alegre, v. 49, n. 3, p. 139-144 jul./ago. 1998.
2. Ramos M., Dias R., Dantas R., Vieira M., Nascimento W. Estudo comparativo in vitro da actividade antibacteriana de productos fitoterápicos sobre bacterias cariogénicas. Odontoped Clin Integr, v. 4, n. 1, p. 33-38, jan./abr. 2004.
3. Avello M., Cisternas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev Med Chile 2010; 138:1288-1293.
4. MINAM (Ministerio del Ambiente): Perú país megadiverso 2009.
5. Rocha P. Biotecnología en Plantas Medicinales y Aromáticas. En: II Segundo Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 2006.
6. Lazo W. Acción antimicrobiana de algunas plantas de uso medicinal en Chile. Bol. Micol 1990; 5(1/2):25-8.
7. Labbé c., Coll J., Connolly J., Faini F., Farrugia L., Rycroft D. Bioactive Flavonones from *Luma chequen*. Collect. Czech. Chem. Commun. 2002, 67, 115-123.
8. Carhuapoma M. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "arrayán" [Tesis Magister]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006.

9. Carpio A. Estudio preliminar de actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra bacterias de la cavidad oral. PE1.1; TL-UPCH, QV770DP6, C28.2008.Lima.
10. Castro A. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* [Tesis Doctoral]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
11. Gonçalves MJ., Cavaleiro C., Proença da Cunha A., Salgueiro L. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Commercially Available Oil of *Luma chequen* (Molina) A. Gray. *Journal of Essential Oil Research: JEOR* 2006;18(1), 108-110.
12. Simirgiotis M., Bórquez J., Schmeda-Hirschmann G. Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC-DAD-ESI/MS profiling of phenolic compounds from the South American berries *Luma apiculata* and *L. chequén*. *Food Chem.* 2013; 139 (1-4): 289 – 99.
13. Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. Edit. Columbia University Press. New York; 1981
14. Sistema de Información de Biodiversidad SIB/ Administración de Parques Nacionales.
15. Reynel C. y J. Marcelo (2009). Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies. Serie Investigación y Sistematización No. 9. Programa Regional ECOBONA – INTERCOOPERATION. Lima.

16. PROTEGE. Red de Protección Social. Gobierno de Chile. Medicamentos Herbarios Tradicionales. MTH.
17. Muñiz M. Etnobotánica de la flora medicinal de la provincia de Paruro. UNSAAC. Cusco. 1992.
18. Sotta N. Plantas aromáticas y medicinales de la región de Arequipa. Edit. Akuaella. Arequipa. 2000.
19. Mostacero LJ, Mejía CF, Gamarra TO. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Edit. Normas Legales. Trujillo. 2002.
20. Martínez A. Aceites Esenciales. Facultad de Química Farmacéutica – Universidad de Antioquía. Medellín. 2003.
21. Barrera M. Aceites esenciales. Programa de Desarrollo Económico Sostenible en Centroamérica. El Salvador. 2008.
22. Torres M., Diaz M., Acosta A. La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en la estomatología. Gaceta Médica Espirituana 2009; 11(1).
23. Morante S. Valoración cruzada y a doble ciego, mediante el modelo de gingivitis experimental, de la eficacia de tres colutorios de clorhexidina sin alcohol frente a la prevención de gingivitis y a la neoformación de placa supragingival [Tesis Doctoral]. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid; 2003.
24. Lim K., Kam PCA. Chlorhexidine - pharmacology and clinical applications. *Anaesthesia and Intensive Care* 2008; 36(4), 502-12.
25. Balandrano F. Soluciones para irrigación en endodoncia: Hipoclorito de Sodio y Gluconato de Clorhexidina. Revista Científica Odontológica. CCDCR 2007; Vol.3 No.1.

26. Arrue M., Ibáñez L. Clorhexidina y Povidona Yodada. Sesiones Clínicas de Ginecología 2007 M.I.R. Edit. Unidad de comunicación del Hospital Donostia-Guatemala.
27. Pomacóndor C. Papel de la clorhexidina en la odontología restauradora. *Odontología Sanmarquina* 2010; 13(2): 46-49.
28. Yevenes I., Reyes J., Campos N., Saragoni V. Efecto inhibitorio en placa microbiana y propiedades antibacterianas de enjuagatorios de clorhexidina. *Av Periodon Implanto!*. 2003; 15, 1: 19-24.
29. Garcia M. B., Carrilho M. R., Nör J.E., Anauate-netto, C., Anido-anido, A., Amore R., Tjäderhane L., Bretz W. A. Chlorhexidine inhibits the proteolytic activity of root and coronal carious dentin in vitro. *Caries Research* 2009; 43(2), 92-6.
30. Modesto A., Drake D. R. Multiple exposures to chlorhexidine and xylitol: Adhesion and biofilm formation by streptococcus mutans. *Current Microbiology* 2006; 52(6), 418-23.
31. George A., Kalangi S., Vasudevan M., Krishnaswamy N. (2010). Chlorhexidine varnishes effectively inhibit porphyromonas gingivalis and streptococcus mutans - an in vivo study. *Journal of Indian Society of Periodontology* 2010; 14(3), 178-180.
32. Alarcón P. Diagnóstico Microbiológico del Género Streptococcus. Laboratorio de Referencias Cocaceas Gran Positivas. Instituto de Salud Pública. Chile. 2011.
33. Lamas M. Estudio de la colonización por estreptococos mutans y hábitos dietéticos durante la lactancia y primera infancia. [Tesis Doctoral]. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid; 2003.



34. Emanuelsson I.R., Thornqvist E. *Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years*. Caries Res, 2000. 34(2): p. 133-9.
35. Masuda N., et al. *Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of Streptococcus mutans in infants*. J Clin Microbiol, 1979. 10(4): p. 497-502.
36. Svanberg M., Krasse B. *Oral implantation of saliva-treated Streptococcus mutans in man*. Arch Oral Biol, 1981. 26(3): p. 197-201.
37. Liébana J. Microbiología Oral. McGraw-Hill (eds), 1995. Cap. 15, pp. 220-239.
38. Stanke F., Urzúa I., Marine A. Nuevas Estrategias en Cariología. 2° Edición. Universidad de Chile. 2001. Cap.2, pp. 16-30.
39. Seki M., Yamahita Y., Torigoe H., Tsuda H., Maeno M. "Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries developmet." Oral Microbiol Inmunol 2006; 21:47-52.
40. Nakano K., Ooshima T. (2009). Serotype classification of streptococcus mutans and its detection outside the oral cavity. Future Microbiology 2009; 4(7), 891-902.
41. Sieber C. Recuento de Streptococcus mutans en muestras de biofilm sobre dientes restaurados con resina compuesta oclusal versus dientes sanos mediante el método de cubeta. [Tesis para optar el título de Cirujano-Dentista]. Santiago, Chile: Universidad de Chile; 2012.
42. Aguilera M., Romano E., Ramos N., Rojas L. Sensibilidad de Streptococcus mutans a tres enjuagues bucales comerciales (Estudio in vitro). ODOUS Científica 2011, Vol. 12 No. 1.

43. Cañigüeral S. Fitoterapia: concepto y ámbito de aplicación. Universidad de Barcelona. Valencia, 2009.
44. Zambrana T. Beneficios de la fitoterapia. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2005 Vol.10 No. 2.
45. Avello M., Cisternas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev Med Chile 2010; 138: 1288-1293.
46. Wikilengua del español. Terminesp: actividad antibacteriana.[http://www.wikilengua.org/index.php/Terminesp:actividad\\_antimicrobiana](http://www.wikilengua.org/index.php/Terminesp:actividad_antimicrobiana)
47. Infomed. Glosario de términos farmacológicos. Formulario Nacional de Medicamentos.<http://glosario.sld.cu/terminosfarmacologicos/2011/04/29/concentracion-inhibitoria-minima-cim/>
48. Infomed. Glosario de términos farmacológicos. Formulario Nacional de Medicamentos.<http://glosario.sld.cu/terminosfarmacologicos/2011/04/29/concentracion-minima-bactericida-cmb/>
49. Negroni M. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2da Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 2009.
50. Sacsquispe R., Velásquez J. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN. Ministerio de Salud del Perú. Instituto Nacional de Salud. Organismo Público Descentralizado de Sector Salud. Lima. 2002.

## IX. ANEXOS

**Tabla 8: Ficha de recolección de datos**

		Concentración del Aceite Esencial de <i>Luma Chequen</i>			Clorhexidina 0.12%	Dimetil sulfóxido
		10%	50%	100%	C (+)	C (-)
HALO DE INHIBICION EN (mm)	Placa Nº 1					
	Placa Nº 2					
	Placa Nº 3					
	Placa Nº 4					
	Placa Nº 5					
	Placa Nº 6					
	Placa Nº 7					
	Placa Nº 8					
	Placa Nº 9					
	Placa Nº 10					
	Placa Nº 11					
	Placa Nº 12					
	Placa Nº 13					
	Placa Nº 14					

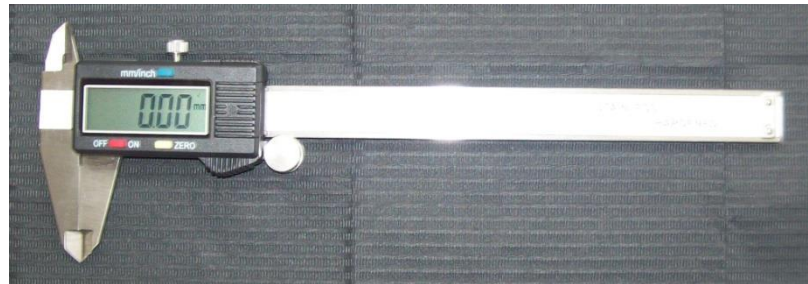


Figura 8: Calibrador digital: DIGITAL CALIPER (0-150mm)

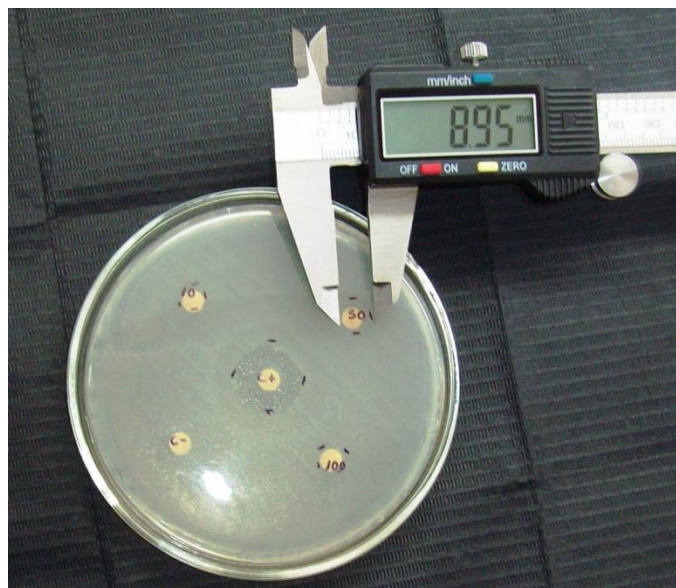


Figura 9: Medición de los halos de inhibición con el calibrador digital